 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.12.02 J South Med Univ, 2015, 35(12): 1672-1677

基础研究

载硫化氢气体超声微泡的制备及其性能评价

陈钢彬[1],杨 莉[2],李新忠[1],钟林涛[1],吴爵非[1],宾建平[1]
南方医科大学南方医院[1]心内科,[2]药学部,广东 广州 510515

摘要:目的 制备一种新型的载硫化氢气体的脂质微泡(HSMB)并评价其理化特性和超声显影能力。**方法** 硫化氢和全氟丙烷按4∶0、3∶1、2∶2、1∶3和0∶4混合后,机械震荡法制备5种载相应混合气体的HSMB,即$HSMB_{4:0}$、$HSMB_{3:1}$、$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$。检测微泡的粒径及浓度并评价其稳定性,优化气体混合比例。选取优化的混合气体制备的HSMB,观察超声辐照对微泡浓度及下清液中硫化氢浓度的影响;观察大鼠心肌及肾脏的超声显影效果。**结果** HSMB外观呈乳白色,镜下呈球形结构,无聚集现象。$HSMB_{4:0}$和$HSMB_{3:1}$微泡初始浓度较$HSMB_{2:2}$明显减少($P<0.05$),且均随时间的延长逐渐降低。$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$微泡初始浓度无差别($P>0.05$),72 h内浓度无变化($P>0.05$)。超声辐照后,$HSMB_{2:2}$微泡浓度显著减少($P<0.05$),而下清液中的硫化氢浓度明显增加($P<0.05$)。$HSMB_{2:2}$静脉注射后获得良好的心脏及肾脏超声显影效果。**结论** 硫化氢和全氟丙烷以2∶2混合制备的HSMB浓度高、稳定性良好,可在超声辐照下释放硫化氢,具有良好的超声显像效果,有望实现硫化氢气体可视化靶向传输。
关键词:微泡;超声;硫化氢

Preparation and characterization of microbubbles loaded with hydrogen sulfide

CHEN Gangbin[1], YANG Li[2], LI Xinzhong[1], ZHONG Lintao[1], WU Juefei[1], BIN Jianping[1]
[1]Department of Cardiology, [2]Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To prepare a phospholipid-coated microbubble loaded with hydrogen sulfide (HSMB) and evaluate its physicochemical and acoustic properties. **Methods** Hydrogen sulfide and perfluoropropane were mixed at the ratios of 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, and 0:4 to prepare hydrogen sulfide-loaded microbubbles (termed $HSMB_{4:0}$, $HSMB_{3:1}$, $HSMB_{2:2}$, $HSMB_{1:3}$, and $HSMB_{0:4}$, respectively). The microbubble concentration and diameter were investigated and their stability were evaluated. The optimal ratio of hydrogen sulfide and perfluoropropane was determined according to the changes of microbubble concentration. The changes of dissolved hydrogen sulfide and concentration of the microbubbles were investigated after exposure to ultrasound, and their acoustic enhancement effects in the myocardium and kidney were observed after intravenous injection in rats. **Results** HSMBs were milky in color and spherical in shape without aggregations. The concentrations of $HSMB_{4:0}$ and $HSMB_{3:1}$ were lower than that of $HSMB_{2:2}$ and decreased with time. $HSMB_{2:2}$, $HSMB_{1:3}$ and $HSMB_{0:4}$ showed comparable concentrations and were stable within 72 h. After exposure to ultrasound, the concentration of $HSMB_{2:2}$ decreased while the dissolved hydrogen sulfide increased significantly. Intravenous injection of $HSMB_{2:2}$ produced a satisfactory contrast-enhancing effect in the myocardium and kidney of rats. **Conclusion** HSMB prepared with the hydrogen sulfide to perfluoropropane ratio of 2:2 has excellent contrast-enhancing effect and is capable of carrying and releasing hydrogen sulfide upon ultrasound exposure to potentially allow visual site-specific delivery of hydrogen sulfide.
Key words: microbubbles; ultrasound; hydrogen sulfide

硫化氢(H_2S)是继一氧化氮和一氧化碳之后发现的第3种气体信号分子,参与多种疾病的病理生理过程,对动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、心力衰竭、高血压等疾病有治疗作用[1]。H_2S的给药方式目前有外源性吸入H_2S气体和供体注射两种方式。针对外源性吸入途径,即使吸入很低浓度的H_2S,也会因其臭味及对呼吸道的刺激而难以耐受[2]。硫化钠和硫氢化钠是目前广泛应用的H_2S供体,由于不同器官对H_2S的敏感性不同,全身给药可能产生不必要的副作用,如血压的急剧变化、中枢神经系统毒性及呼吸抑制等[2-4]。因此,若能实现H_2S靶向性给药或可避免其副反应发生。

超声微泡不仅是临床常用的超声造影剂,还可作为携带治疗性气体的良好载体,具有实现靶向传输H_2S气体的潜能[5]。利用超声微泡现已实现了一氧化氮和氧气的靶向性传输且取得良好的治疗效果。Tong等[6]制

收稿日期:2015-10-02
基金项目:国家自然科学基金(81101064);广州市科技计划项目(201506010021)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81101064).
作者简介:陈钢彬,在读硕士研究生,E-mail: gangbinchen@126.com
通信作者:吴爵非,博士,副研究员,E-mail: jaffi@qq.com;宾建平,博士,教授,电话:020-62787390,E-mail: jianpingbin@126.com

备了载一氧化氮的微泡并证实该微泡联合超声波辐照增加干细胞向心肌归巢,促进血管新生,改善心功能。McEwan等[7]制备的载氧气微泡可改善肿瘤的缺氧环境,增强声动力治疗效果。然而,载H_2S气体超声微泡的制备仍未见报道。因此,本研究拟构建一种载H_2S气体的超声微泡并验证其理化特性和超声显影效果,为下一步可视化输送H_2S实现靶向治疗提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及仪器

1.1.1 动物 SD大鼠6只,雌雄不限,体质量250~300 g,由南方医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,Advanti,美国)、二棕榈酰磷脂酸(DPPA,Advanti,美国)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000 (DPPE-PEG5000,Advanti,美国)、全氟丙烷(纯度99.9%,佛山市科的气体化工有限公司,中国)、H_2S气体(纯度99.9%,佛山市科的气体化工有限公司,中国)、硫化钠(Sigma-Aldrich,美国)、N,N-二甲基对二苯胺盐酸盐(Sigma-Aldrich,美国)、醋酸锌(Sigma-Aldrich,美国)、三氯化铁(光华科技股份有限公司,中国)。其它试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器 银汞胶囊调合器(杭州中润医疗器械有限公司,中国)、显微镜(OLYMPUS BX51,日本)、库尔特计数仪(Multisizer 3,美国)、离心机(Scanspeed 406,Labogene,丹麦)、全自动酶标仪(SpectraMax M5/M5e,Molecular Devices,美国)、Sequoia512超声心动图仪(Siemens,德国)、超声空化治疗仪(DCT-700,深圳市威尔德医疗电子有限公司,中国)。

1.2 载H_2S微泡(HSMB)的制备

不同比例的H_2S和全氟丙烷按照4:0、3:1、2:2、1:3和0:4混合后,采用机械震荡法制备5种载相应比例的H_2S和全氟丙烷混合气体的HSMB,分别为$HSMB_{4:0}$、$HSMB_{3:1}$、$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$。按摩尔比10:82:8称取DPPC、DPPE-PEG5000及DPPA,加至含丙二醇、甘油和NaCl的水溶液中,于70 ℃水浴搅拌15 min至完全溶解制成磷脂分散液,分别取2 mL分装于3 mL玻璃瓶中,过量H_2S饱和后密封保存[8]。不同比例的混合气体分别置换玻璃瓶顶空气体,置于银汞胶囊调合器上3200次/min振荡50 s制得5种不同的HSMB。

1.3 不同时间点5种HSMB的粒径及浓度

HSMB制备成功后,在不同时间点(0、1、6、24、72 h)取一滴微泡溶液于玻片上,置显微镜下观察微泡的形态、大小等;取20 μL在库尔特计数仪下检测、分析微泡的粒径分布和浓度,评估其稳定性,优选出最佳的气体混合比例。

1.4 超声辐照对HSMB微泡浓度及H_2S释放的影响

选取最佳比例混合气体制备的HSMB,低速离心(400 g,1 min)后以蒸馏水洗涤数次置换下清液以去除溶液中溶解的H_2S及过量脂质,抽取2 mL于注射器中,顶端用胶塞密封,分为超声组及对照组。超声组采用超声治疗仪发射的超声波(发射频率1.0 MHz,声压1.0 MPa)进行辐照,对照组不予超声处理,取20 μL混悬液在库尔特计数仪下检测微泡的浓度,然后低速离心,取下清液75 μL测溶解H_2S浓度,每隔5 min测量1次。H_2S浓度测量采用亚甲蓝分光光度法,75 μL下清液中加入250 μL 1%醋酸锌及蒸馏水425 μL孵育10 min,然后加入N,N-二甲基对苯二胺盐酸盐(20 mmol/L)/HCl(7.2 mol/L)缓冲液133 μL及$FeCl_3$(30 mmol/L)/HCl(1.2 mol/L)缓冲液133 μL,充分混匀静置20 min。取200 μL于96孔板中,全自动酶标仪在波长670 nm测定吸光度,根据Na_2S标准曲线计算溶液中的H_2S浓度,单位为μmol/L。

1.5 HSMB心肌及肾脏超声显影效果

在体观察最佳比例混合气体制备的HSMB超声显影效果。SD大鼠采用戊巴比妥50 mg/kg腹腔麻醉后仰卧位固定于鼠板上,心前区、腰部脱毛。尾静脉留置穿刺针以备注射HSMB。用自制支架固定超声探头(15L8)于大鼠心前区或肾区,获得满意的二维图像切面后保持位置及参数在实验过程中不变。经尾静脉团注0.1 mL HSMB后,使用Sequoia512超声心动图仪,对比脉冲序列(Contrast Pulse Sequencing, CPS)成像技术行心肌及肾脏对比超声检查,探头发射频率为7.0 MHz,机械指数为0.18。实验结束后全部声学造影图像存盘。

1.6 统计学分析

运用SPSS 19.0软件进行统计学分析,所有数值均以均数±标准差表示。HSMB初始微泡浓度及粒径比较采用单因素方差分析,Bonferroni进行多重比较。HSMB微泡稳定性及超声辐照对H_2S释放的数据采用重复测量数据的方差分析进行比较。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSMB的浓度、粒径和稳定性

制备后即刻观察,5种HSMB外观呈均匀乳白色;$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$肉眼观无差别;$HSMB_{4:0}$和$HSMB_{3:1}$颜色较其他3组淡,$HSMB_{4:0}$尤为明显(图1)。显微镜下微泡呈中心透亮,外壳光滑的完整圆球形,分散度好,无明显聚集现象;$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$形态均匀,数量无明显差别;$HSMB_{4:0}$和$HSMB_{3:1}$数量较其他3组少,$HSMB_{4:0}$尤为明显(图1)。库尔特计数仪检测结果示,$HSMB_{4:0}$微泡浓度明显少于

$HSMB_{3:1}$、$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$(所有P<0.05)；$HSMB_{3:1}$微泡浓度明显少于$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$(所有P<0.05)；$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$微泡浓度无明显差别(所有P>0.05，图2A)。$HSMB_{4:0}$平均粒径明显大于$HSMB_{3:1}$、$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$(所有P<0.05)。$HSMB_{3:1}$、$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$的平均粒径无差别(所有P>0.05，图2B)。

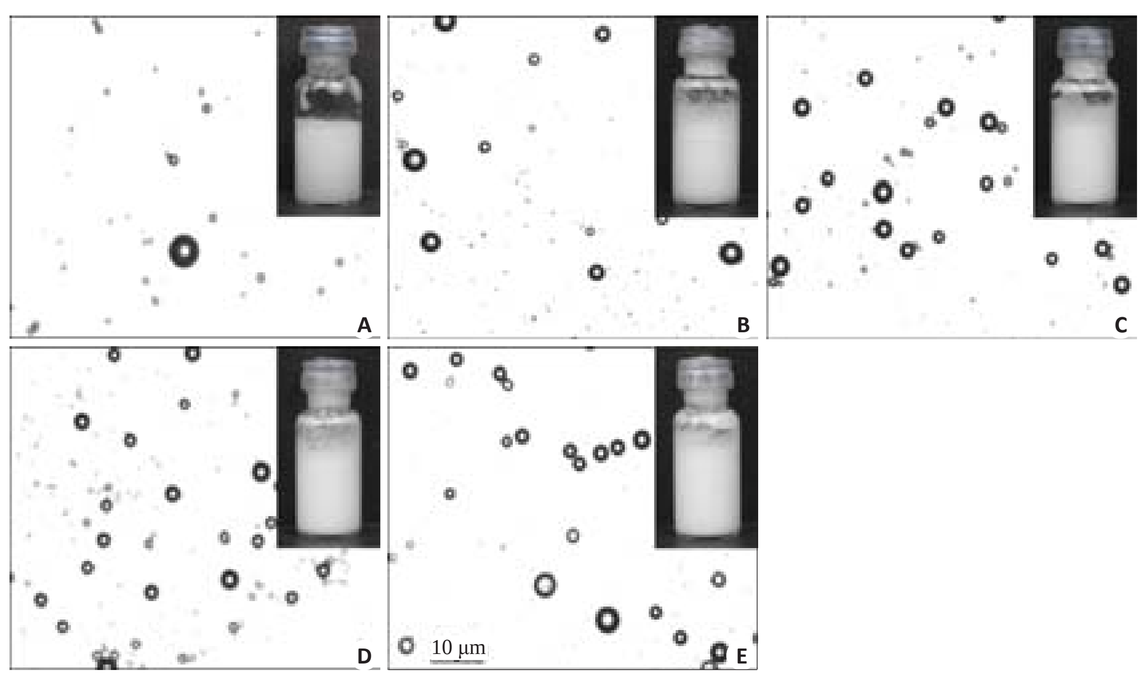


图1 载不同比例混合气体的HSMB的外观和光镜下形态特点

Fig.1 Gross appearance and microscopic observation of HSMBs prepared with different ratios of mixture gases. *A*: $HSMB_{4:0}$; *B*: $HSMB_{3:1}$; *C*: $HSMB_{2:2}$; *D*: $HSMB_{1:3}$; *E*: $HSMB_{0:4}$.

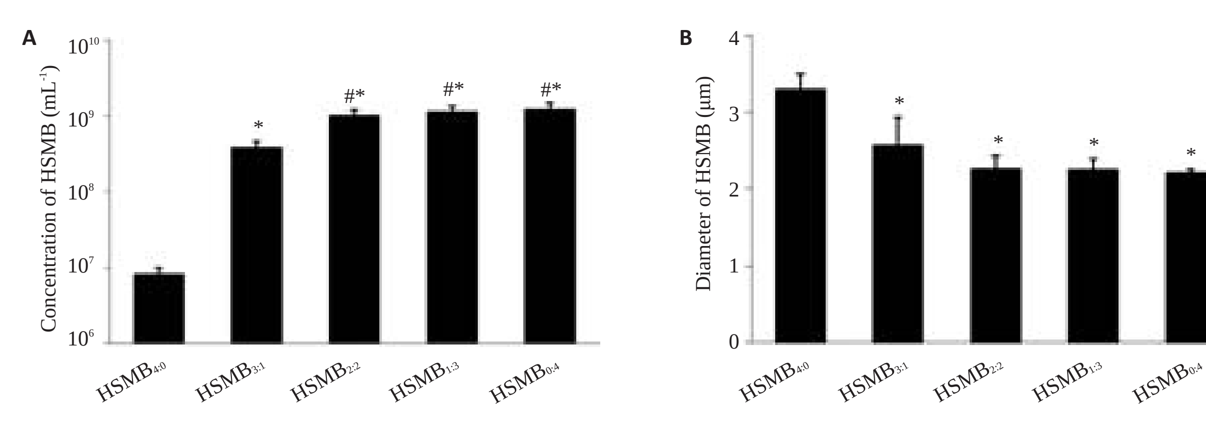


图2 载不同比例混合气体的HSMB的微泡浓度及粒径

Fig.2 Concentration (*A*) and diameter (*B*) of HSMBs prepared with different ratios of mixture gases. *P<0.05 *vs* $HSMB_{4:0}$; #P<0.05 *vs* $HSMB_{3:1}$.

表1 载不同比例混合气体的HSMB微泡浓度随时间的变化

Tab.1 Changes of HSMB concentration at different time points

Group	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
$HSMB_{4:0}$	$(8.09±1.88)×10^6$	$(4.67±1.19)×10^{6\#}$	$(3.93±1.11)×10^{6\#}$	$(3.25±0.63)×10^{6\#}$	$(2.98±0.45)×10^{6\#}$
$HSMB_{3:1}$	$(3.56±0.99)×10^8$	$(3.15±0.56)×10^8$	$(1.90±0.36)×10^{8\#}$	$(1.22±0.27)×10^{8\#}$	$(0.61±0.11)×10^{8\#}$
$HSMB_{2:2}$	$(1.01±0.19)×10^9$	$(1.04±0.18)×10^9$	$(1.00±0.12)×10^9$	$(0.97±0.11)×10^9$	$(0.87±0.16)×10^9$
$HSMB_{1:3}$	$(1.13±0.21)×10^9$	$(1.04±0.22)×10^9$	$(1.03±0.14)×10^9$	$(1.01±0.15)×10^9$	$(0.97±0.14)×10^9$
$HSMB_{0:4}$	$(1.21±0.27)×10^9$	$(1.14±0.24)×10^9$	$(1.13±0.18)×10^9$	$(1.03±0.23)×10^9$	$(1.01±0.17)×10^9$

#P<0.05 *vs* 0 h.

$HSMB_{4:0}$微泡浓度于1 h后开始降低。$HSMB_{3:1}$微泡浓度于6 h后开始降低并进行性减少。$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$微泡浓度在72 h内无变化（表1）。这说明$HSMB_{4:0}$和$HSMB_{3:1}$稳定性差于$HSMB_{2:2}$、$HSMB_{1:3}$和$HSMB_{0:4}$。因此，为了尽量提高微泡的H_2S载气量同时保证稳定性，我们认为H_2S和全氟丙烷按照2∶2混合是制备HSMB的最佳比例。下面对$HSMB_{2:2}$进行进一步评价。$HSMB_{2:2}$粒径分布于0~9 μm，绝大部分的微泡粒径小于8 μm（图3）。

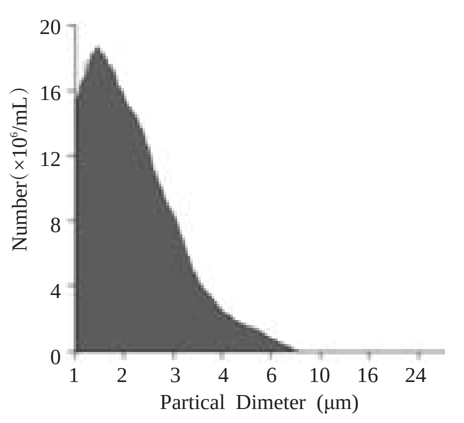


图3 $HSMB_{2:2}$的粒径分布图

Fig.3 Size distribution of $HSMB_{2:2}$.

2.2 超声辐照对$HSMB_{2:2}$微泡浓度及H2S释放的影响

为了验证制备的$HSMB_{2:2}$是否包裹H_2S及超声能否触发H_2S释放，我们将$HSMB_{2:2}$分为超声组及对照组。给予1.0 MHz，1.0 MPa的超声波辐照后，$HSMB_{2:2}$浓度迅速降低，5 min内从$(1.01\pm0.19)\times10^9$/mL减少至$(2.12\pm0.63)\times10^7$/mL（$P<0.05$），下清液中的H_2S浓度从87.2±25.3 μmol/L增加至254.66±43.30 μmol/L（$P<0.05$），5 min后浓度趋于平稳。与对照组相比，各个时间点HSMB数目均显著减少（$P<0.05$），下清液中H_2S浓度显著增加（$P<0.05$，图4）。

2.2 $HSMB_{2:2}$心肌及肾脏超声显影效果

获得满意的心脏或肾脏的二维图像后（图5A、D），CPS成像模式未见增强显影（图5B、E）。经静脉注射$HSMB_{2:2}$后3±1s可见心肌和肾脏显影，逐渐增强，12±2 s后达到平台期，此时$HSMB_{2:2}$填充均匀，与周围组织分界清晰（图5C、F）。随后显影强度逐渐减弱，12±3 min后消失。

3 讨论

超声微泡是一种由生物外壳包裹气体核心构成的超声造影剂，可作为传输基因[9]、药物[10]甚至治疗性气体[5, 6, 11-13]的良好载体。在高强度的超声波作用下，微泡

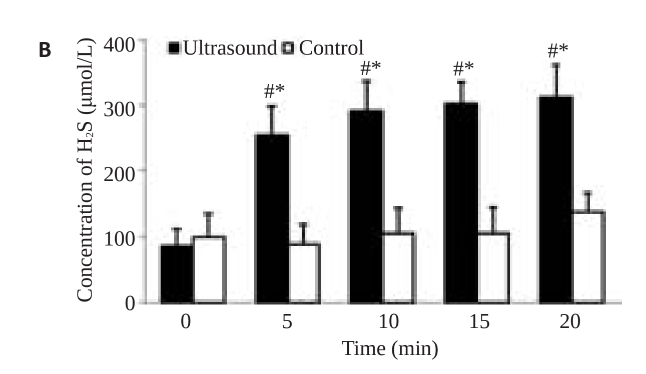




图4 超声辐照对$HSMB_{2:2}$微泡浓度及H_2S释放的影响

Fig.4 Effect of ultrasound sonication on $HSMB_{2:2}$ concentration (*A*) and H_2S release (*B*).$^*P<0.05$ *vs* control group; $^\#P<0.05$ *vs* 0 min.

发生剧烈震荡甚至破裂，破裂后其携带的物质将在局部释放，从而实现靶向输送[5]。因此，若能制备载H_2S气体的超声微泡，结合局部的超声辐照即可实现靶向传输H_2S，然而，目前仍未见报道。本实验创新性制备了稳定性良好的载H_2S气体的脂质超声微泡；初步探讨了H_2S和全氟丙烷最佳的混合比例；体外验证超声触发H_2S释放的可行性；在体证实该微泡具有良好的超声显影效果。这为下一步可视化输送H_2S进而实现靶向治疗提供研究基础。

制备稳定的载H_2S气体的超声微泡是实现H_2S靶向性传输的前提。H_2S作为一种小分子的活跃性气体，易受Laplace压力[14]的影响溢出微泡，使得微泡浓度及稳定性均较差。有文献报道在制备载一氧化氮[16]或氧气[11, 17]的微泡过程中，加入全氟丙烷可增加微泡的稳定性和浓度，原因在于全氟丙烷作为大分子的惰性气体难以溢出微泡壳膜[15]，因此平衡了微泡和外周的压力，减少了氧气或一氧化氮的外溢。鉴于此，我们拟加入全氟丙烷气体以增加载H_2S超声微泡的稳定性，然而，全氟丙烷的加入势必减少了H_2S的含量。为了平衡微泡的稳定性及H_2S的载气量，我们初步探究H_2S和全氟丙烷的最佳混合比例。实验结果显示，随着全氟丙烷气体含量的增加，微泡的稳定性及浓度逐渐增加；当H_2S和全

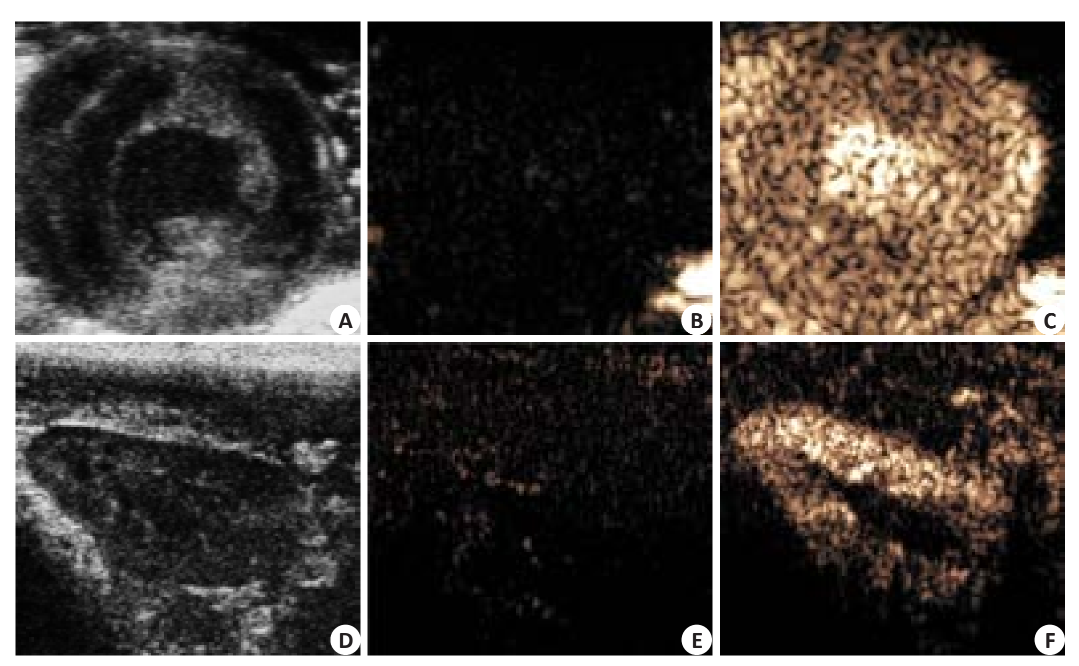


图5 $HSMB_{2:2}$的超声造影效果

Fig.5 Ultrasound contrast-enhancing effect of $HSMB_{2:2}$. *A, D*: Two-dimensional ultrasound images of the heart and kidney; *B, E:* Contrast-enhanced ultrasound images of the heart and kidney before $HSMB_{2:2}$ injection; *C, F*: Contrast-enhanced ultrasound images of the heart and kidney after $HSMB_{2:2}$ injection.

氟丙烷的混合比例达到2∶2时，制备的HSMB浓度较高且72 h内的稳定性良好，且不再随全氟丙烷含量的增加而增加。因此，我们认为H_2S和全氟丙烷2∶2混合是制备稳定的HSMB的最佳比例。

为了验证最佳比例混合气体制备的HSMB是否包裹H_2S及超声能否触发H_2S释放，我们用超声辐照$HSMB_{2:2}$并观察微泡浓度及下清液中H_2S浓度的变化。结果显示超声辐照之后微泡破裂，微泡浓度迅速减少，而溶液中H_2S浓度迅速增加。这说明制备的$HSMB_{2:2}$包裹有H_2S且超声能触发H_2S气体释放。实验亦发现对照组中第20 min $HSMB_{2:2}$数量较基线减少，这可能是由于离心过程造成的微泡丢失。另外，本实验采用的亚甲基蓝分光光度法可准确反映H_2S的浓度。该方法目前广泛应用于液体中H_2S浓度的测量，检测流程简单，灵敏度高，稳定性好。其原理是：H_2S与醋酸锌反应生成硫化锌沉淀；硫化锌在强酸条件下与N,N-二甲基对苯二胺盐酸盐和三氯化铁反应形成蓝色的亚甲基蓝螯合物，在可见光波长670 nm处有特异性的收峰[18]。测量670 nm处的吸光度，根据绘制的标准曲线即可计算H_2S的浓度。

本实验制备的$HSMB_{2:2}$同时具有良好的超声显影效果。我们制备的$HSM_{2:2}$的浓度为$(1.01\pm0.19)\times10^9$/mL，平均粒径2.25 ± 0.17 μm，几乎全部小于红细胞直径(8 μm)，满足超声造影剂的基本要求。经静脉注射后，该微泡能穿过肺部毛细血管进入体循环，均匀填充于心肌及肾脏组织中，具有良好的超声显影效果，有助于实现H_2S气体的可视化传输。

本实验制备的HSMB具有广泛的应用前景。近期研究发现，H_2S参与众多疾病的病理生理过程，有望成为新的治疗手段。外源性给予H_2S可通过减少oxLDL诱导的泡沫细胞形成，抑制血管内皮ICAM-1的表达延缓$apoE^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化斑块的进展[19]。H_2S通过抑制MAPK1/3/MMP-8信号通路改善糖尿病大鼠心肌纤维化[20]。在压力负荷诱导的心力衰竭小鼠模型上，H_2S能活化一氧化氮合成酶，增加一氧化氮生物活性，从而延缓心力衰竭进展为失代偿性心力衰竭[21]。在小鼠心肌缺血再灌注损伤的模型上，Elrod等[22]在再灌注的同时心腔注射硫化钠，结果显示心梗面积减少72%，心功能显著改善。因此，H_2S作为治疗性气体具有诱人的应用前景。然而，H_2S系统性给药可能产生毒副作用，如血压的急剧变化、中枢神经系统毒性及呼吸的抑制等[2-4]。运用我们制备的HSMB结合局部超声波辐照可视化输送H_2S或可实现靶向治疗，从而避免H_2S全身性给药而产生的副作用。

总之，H_2S和全氟丙烷按照2∶2混合制备的HSMB浓度高、稳定性良好，能携带H_2S气体并可被超声触发释放，同时具有良好的超声显像效果，有助于可视化传输H_2S气体实现靶向治疗，从而避免系统给药产生的毒副作用。

参考文献：

[1] Polhemus DJ, Lefer DJ. Emergence of Hydrogen sulfide as an

endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2014, 114(4): 730-7.

[2] Beauchamp Ro Jr, Bus JS, Popp J A, et al. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity[J]. Crit Rev Toxicol, 1984, 13 (1): 25-97.

[3] Yoo D, Jupiter RC, Pankey EA, et al. Analysis of cardiovascular responses to the H2S donors Na2S and NaHS in the rat[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(4): H605-14.

[4] Almeida AF, Guidotti TL. Differential sensitivity of lung and brain to sulfide exposure:a peripheral mechanism for apnea[J]. Toxicol Sci, 1999, 50(2): 287-93.

[5] Fix SM, Borden MA, Dayton PA. Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes[J]. J Control Release, 2015, 209: 139-49.

[6] Tong JY, Ding JD, Shen XB, et al. Mesenchymal stem cell transplantation enhancement in myocardial infarction rat model under ultrasound combined with nitric oxide microbubbles[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80186.

[7] Mcewan C, Owen J, Stride E, et al. Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours[J]. J Control Release, 2015, 203: 51-6.

[8] 谭开彬, 高云华, 刘 平, 等. 机械振荡法制备脂膜超声造影剂的初步实验研究[J]. 中国超声医学杂志, 2006(8): 561-3.

[9] Fujii H, Li SH, Wu J, et al. Repeated and targeted transfer of angiogenic plasmids into the infarcted rat heart via ultrasound targeted microbubble destruction enhances cardiac repair[J]. Eur Heart J, 2011, 32(16): 2075-84.

[10] Sato T, Mori S, Sakamoto M, et al. Direct delivery of a cytotoxic anticancer agent into the metastatic lymph node using nano/ microbubbles and ultrasound[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e123619.

[11] Eisenbrey JR, Albala L, Kramer MR, et al. Development of an ultrasound sensitive Oxygen carrier for Oxygen delivery to hypoxic tissue[J]. Int J Pharm, 2015, 478(1): 361-7.

[12] Britton GL, Kim H, Kee PH, et al. *In vivo* therapeutic gas delivery for neuroprotection with echogenic liposomes[J]. Circulation, 2010, 122(16): 1578-87.

[13] Mcewan C, Owen J, Stride E, et al. Oxygen carrying microbubbles for enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumours[J]. J Control Release, 2015, 203: 51-6.

[14] Kwan JJ, Borden MA. Lipid monolayer collapse and microbubble stability[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2012, 183: 82-99.

[15] Szijjarto C, Rossi S, Waton G, et al. Effects of perfluorocarbon gases on the size and stability characteristics of Phospholipid-Coated microbubbles: osmotic effect versus interfacial film stabilization[J]. Langmuir, 2012, 28(2): 1182-9.

[16] Sutton JT, Raymond JL, Verleye MC, et al. Pulsed ultrasound enhances the delivery of nitric oxide from bubble liposomes to *ex vivo* porcine carotid tissue[J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 4671-83.

[17] Kwan JJ, Kaya M, Borden MA, et al. Theranostic Oxygen delivery using ultrasound and microbubbles[J]. Theranostics, 2012, 2(12): 1174-84.

[18] 郑 扬, 廖 锋, 杜军保, 等. 改良亚甲基蓝法测定血浆硫化氢[J]. 生理学报, 2012(6): 681-6.

[19] Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of Hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(2): 173-9.

[20] 李 芳, 曾 欧, 罗 健, 等. 硫化氢对糖尿病大鼠心肌纤维化及MAPK1/3和MMP-8表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2015(4): 549-52.

[21] Kondo K, Bhushan S, King AL, et al. H(2)S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase[J]. Circulation, 2013, 127(10): 1116-27.

[22] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (39): 15560-5.

（编辑：吴锦雅）